

PRODUCTION OF POLYMER FINE PARTICLE USING ORGANISM

Publication number: JP2000166587

Publication date: 2000-06-20

Inventor: KAWABATA YUJI; IMAMURA TAKESHI; SUGAWA ETSUKO

Applicant: CANON KK

Classification:

- international: **C12P7/62; C08L101/16; C12R1/01; C12R1/05; C12R1/11; C12R1/40; C12P7/62; C08L101/00;** (IPC1-7): C12P7/62; C12P7/62; C12R1/01; C12P7/62; C12R1/05; C12P7/62; C12R1/40; C12P7/62; C12R1/11

- European:

Application number: JP19980344508 19981203

Priority number(s): JP19980344508 19981203

Report a data error here

Abstract of **JP2000166587**

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain polymer fine particles while maintaining the shape by bringing an organism having polymer fine particles into contact with a solubilizing agent for solubilizing an organism component other than the polymer fine particles, recovering the polymer fine particles from the mixture and drying the polymer fine particles at a specific temperature. SOLUTION: In a method for separating polymer fine particles using an organism, a microorganism [e.g. Burkholderia cepacia KK01 strain (FERM M BP-4235)] having the polymer fine particles consisting mainly of polyhydroxyalkanoate, etc., is obtained and the bacterium is brought into contact with a solubilizing agent (sodium hypochlorite-containing aqueous solution) for solubilizing an organism component other than the polymer fine particles to afford a mixture containing the polymer fine particles. Then, the polymer fine particles are recovered from the mixture and the recovered polymer fine particles are dried at a temperature not higher than the melting point of the polymer fine particles to provide the objective polymer fine particles useful as an environmental harmony type biodegradable plastic, etc., while retaining the form of the polymer fine particles.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2000-166587
(P2000-166587A)

(43)公開日 平成12年6月20日(2000.6.20)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 P 7/62		C 1 2 P 7/62	4 B 0 6 4
// (C 1 2 P 7/62			
C 1 2 R 1:01)			
(C 1 2 P 7/62			
C 1 2 R 1:05)			

審査請求 未請求 請求項の数13 O L (全 9 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平10-344508

(22)出願日 平成10年12月3日(1998.12.3)

(71)出願人 000001007

キヤノン株式会社

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

(72)発明者 川畑 裕司

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ
ノン株式会社内

(72)発明者 今村 剛士

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ
ノン株式会社内

(74)代理人 100088328

弁理士 金田 暢之 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生物を用いた高分子微粒子の製造方法

(57)【要約】

【課題】 微粒子状での用途に利用できる高分子微粒子を生体からその形状を維持した状態で分離することができる生体からの高分子微粒子の製造方法を提供すること。

【解決手段】 高分子微粒子を生産蓄積している生体と、高分子微粒子以外の生体成分を可溶化する可溶剤とを接触させて得られた混合物から高分子微粒子を回収し、乾燥させる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生体を用いた高分子微粒子の製造方法において、

高分子微粒子を有する生体を取得する工程と、
該生体と、該高分子微粒子以外の生体成分を可溶化する可溶化剤と、を接触させて該高分子微粒子を含む混合物を得る工程と、
該混合物から該高分子微粒子を回収する工程と、
回収された高分子微粒子を該高分子微粒子の融点以下の温度で乾燥させて、該高分子微粒子の形状を保ったままの高分子微粒子の乾燥品を得る工程とを有することを特徴とする高分子微粒子の製造方法。

【請求項2】 該生体が真核細胞あるいは原核細胞のいずれかであることを特徴とする請求項1に記載の製造方法。

【請求項3】 該原核細胞がバークホルデリア・セバシヤ (*Burkholderia cepacia*)、ラルストニア・ユウトロファ (*Ralstonia eutropha*)、アルカリゲネス スピーズ (*Alcaligenes sp.*)、アルカリゲネス・ロータス (*Alcaligenes latus*)、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、アエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*)、バチルス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) 及びコマモナス・アシドボランス (*Comamonas acidovorans*) からなる群から選択された少なくとも1種である請求項2に記載の製造方法。

【請求項4】 該高分子微粒子がポリヒドロキシアルカノエートを主成分として含む請求項1に記載の製造方法。

【請求項5】 該ポリヒドロキシアルカノエートがポリヒドロキシ酪酸またはポリヒドロキシ吉草酸である請求項4に記載の製造方法。

【請求項6】 該高分子微粒子の大きさが0.1 μ m〜5 μ mの範囲にある請求項1に記載の製造方法

【請求項7】 該可溶化剤が次亜塩素酸ナトリウムを含む水溶液である請求項1に記載の製造方法。

【請求項8】 該次亜塩素酸ナトリウムの有効塩素濃度が0.05〜5重量%である請求項7に記載の製造方法。

【請求項9】 該回収された高分子微粒子の乾燥が風乾あるいは凍結乾燥である請求項1に記載の製造方法。

【請求項10】 該可溶化剤と該生体を接触させる前に、pH9以上のアルカリ水溶液と該生体を接触させる請求項1に記載の製造方法。

【請求項11】 該可溶化剤と該生体を接触させる前に、該生体成分を分解する酵素を含んだ水溶液と該生体を接触させる請求項1に記載の製造方法。

【請求項12】 該酵素がリゾチームである請求項11に記載の製造方法。

【請求項13】 該可溶化剤と該生体を接触させる前に、該生体を加圧破碎あるいは超音波破碎する請求項1に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、生物の代謝反応を利用した高分子材料として有用な高分子微粒子の製造方法に関するものである。より詳しくは、微生物等の生体が産生する高分子微粒子をそのままの形状で取得することができ、成形工程を経ずにそのまま微粒子状での用途に利用できることも可能とする生体からの高分子微粒子の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】高分子材料は現代の産業や生活に不可欠のものであり、安価軽量であること、成形性がよいことなどから家電品の筐体をはじめ包装材や緩衝材、あるいは繊維材料など多岐にわたって使用されている。これら高分子材料の中で主に構造材として用いられているプラスチックは世界中で年間1.2億トンも生産されており、その一方で廃棄されるプラスチックはその50%以上といわれている。この廃棄プラスチックの処理方法は主に焼却あるいは埋め立てであるが、ポリ塩化ビニルなどの含塩素プラスチックを焼却処理するとダイオキシンなどのさらに有害物質を生成する場合があります、環境面への影響といった点において問題が多い。また、埋め立て方法は広大な処理場を必要とする上、最近ではプラスチックあるいはこれに含まれる可塑剤などが流出して、これが生体に対して内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）として働いている場合があることが明らかになってきている。従って、このような廃棄プラスチックを減量する技術開発は、限りある資源の有効利用や環境保全の観点からも急務である。

【0003】廃棄プラスチックを減らす方法としては、

1. 使用しているプラスチック材が本当に必要なのか、代替の材料はないのかを再考する、
2. 不必要・過剰な使用をやめて、プラスチックの使用量を減らす、
3. 廃棄プラスチックを原料として回収し、再度プラスチック材として用いる、
4. 廃棄プラスチックを部品として回収し、再度利用する、

などが考えられる。いずれもプラスチックの材料設計から製品設計・製品製造まで一連の流れの中で考えなければならず、また回収・再利用のための技術開発や流通システムの整備も不可欠である。しかし、廃棄プラスチックの回収が困難あるいは回収に高い費用を要するような場合、廃棄後に環境中の微生物により分解される生分解性プラスチックを用いることが極めて有用となる。

【0004】このような環境調和型（環境低負荷型）の生分解性プラスチックの用途は主に次の二つに分けられる。

一つは、生分解性プラスチックからなる製品が自然環境中でその形態や機能を保持した状態で利用され、これが自然環境へ流失した場合でも微生物などにより分解

消滅できる用途である。例えば、漁網や釣り糸、土壌の保水材料などが挙げられる。もう一つは、生分解性プラスチックからなる製品が人間社会の中で利用され、廃棄後は微生物などにより分解消滅できる用途である。例えば、電化製品の筐体や包装用フィルム、ゴミ袋などが挙げられる。

【0005】これまで上記のような目的で多くのメーカーによって生分解性プラスチックが生産されている。例えば、脂肪族ポリエステルについては、モンサント（商品名バイオポール）、ダイセル化学工業（商品名セルグリーン）、昭和高分子（商品名ビオノーレ）、日本触媒（商品名ルナーレSE）、島津製作所（商品名ラクティ）、三井東圧化学（商品名レイシア）、あるいはカーギル（商品名エコプレイ）などが挙げられる。また、ポリビニルアルコールについては、クラレ（商品名ポパール）、多糖では日本合成化学工業（商品名マタービー）、チッソ（商品名ノボン）、日本コーンスターチ（商品名エパーコーン）、ダイセル化学工業（商品名セルグリーン）、日本触媒（商品名ルナーレZT）、あるいはアイセロ化学（商品名ドロンCC）などが挙げられる。

【0006】これら生分解性プラスチックは、微生物などの生体を用いて直接合成させたり、あるいは安価な原料から発酵などの生体機能を用いてモノマーを合成し、これを通常の化学合成により重合する方法などによって得られている。

【0007】なお、前者の方法により得られた生分解性プラスチックは、タンパク質などのバイオマスと分離するために溶媒洗浄や溶媒抽出等により精製する必要がある。この精製工程については、例えば特開昭55-118394号公報には、ポリ-β-ヒドロキシブチレート(PHB)を含む微生物を加熱乾燥後にアセトンまたはメタノールで洗浄し、1,2-ジクロロエタンで抽出する方法が記載されている。また、USP5096819号公報あるいはUSP505936号公報には、微生物を純水、エタノール、及びアセトンで洗浄し、クロロホルムでPHBを抽出する方法が述べられている。さらにUSP5395919号公報には、微生物をアセトンで洗浄し、クロロホルム、塩化メチレン、あるいはピリジンなどでポリ-β-ヒドロキシアルカノエート(PHA)を抽出して精製する方法が開示されている。

【0008】また、特開昭60-145097号公報ではPHBを含有する微生物細胞より細胞物質のみを除去して高分子を精製する方法が述べられている。具体的には、PHBを含有する微生物をタンパク分解酵素や界面活性剤で処理して高分子以外の細胞物質を可溶化し、またこの可溶化処理の工程前あるいは工程中において微生物含有水溶液を80℃以上に加熱して細胞物質を変性させ、可溶化を促進させる方法である。可溶化処理後にはPHBのクロロホルム等での抽出が行なわれ、純度の高い高分子が得られている。Pageらは5.25%の次亜塩素酸ナトリウムを用いて微生物より細胞物質を除去し、PHBをクロロホルムで抽

出する方法を述べている(App. Environ. Microbiol. 59, 4236-4244(1993))。以上のような精製方法では最終的に高分子を有機溶媒に抽出するので、生分解性プラスチック(生分解性高分子)はバルク原料として供給されることになる。

【0009】一方、生分解性プラスチックの微粒子を作製する方法としては、例えばBarnardらは微生物が内包している高分子微粒子の自然状態における物理化学的性状を検討する目的で、高分子微粒子をそのままの性状で取り出す方法を述べている(FEBS Lett. 231, 16-18(1988))。この方法は微生物をリゾチームとDNaseで処理して細胞物質を分解し、さらに超音波処理するものである。しかしながら、その実施例のところで述べるように、同様な方法で処理したPHB微粒子を走査型電子顕微鏡で観察すると高分子微粒子の周囲に分解できなかった細胞物質が残存しており、不純物が多い高分子微粒子となるため、工業目的でこれをそのまま利用するには問題がある。従って、工業用途に利用できるような純度の高い高分子微粒子をそのままの形状で取り出すには、さらなる工夫が必要である。

【0010】また、特開平05-009132号公報には、生分解性高分子に有機合成的に気体あるいは薬剤を内包させた微粒子が開示されている。この方法は、内包されたガス成分が生体内の超音波造影剤として働き、また内包させた薬剤により治療効果を得るというものである。さらに、特開平05-221855号公報には、乳酸とグリコール酸の共重合体を合成し、これに薬理活性をもつペプチドを内包させた微粒子が開示されている。この微粒子を用いると、生体内に入れられた微粒子は徐々に分解されペプチド成分が少しずつ溶解するため、持続性のある投薬が可能である。ここに挙げたいずれの提案においても、生分解性高分子はin vitroで微粒子化され、これに種々の機能が付加されている。

【0011】また、特開平05-271458号公報では、パルプ材と生分解性の増粘剤を混合し、生分解で生じた気泡によりパルプ材を基材とする発泡微粒子を作製する方法が述べられている。パルプ材も生分解性をもっているので使用後に埋め立てや焼却処分が可能であり、環境調和型の緩衝材料となりうる。

【0012】一方、生体機能により合成された高分子(プラスチック)は生体内で微粒子として分散している場合が多く、このような微粒子状で存在する高分子を抽出濃縮せずにそのままの形状で取り出すことができれば、そのミクロな形状を活かした新しい用途開発が可能となる。例えば、微生物は数マイクロメートルの形状なので、微生物に内包される高分子微粒子はさらに小さく、その粒径分布に応じてバインダやコート剤、あるいはミクロ構造材として利用することができる。しかしながら、そのような高分子微粒子の合成及び取得についての試みは従来なされていない。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】生分解性プラスチックは廃棄後コンポストとなり環境に残留することがないため、極めて環境に調和した材料であり、現在使用されているプラスチックの数割が生分解性プラスチックに代替されれば、環境負荷を著しく低減できると予測されている。この生分解性プラスチック原料は微生物などの生体機能を利用して、あるいは有機合成的に生産することができる。得られた原料は従来のプラスチック材料と同様に射出成形や金型成形により製品化される。また、熱延伸等でフィルム化あるいは繊維化してから成形することも可能である。一方、生分解性プラスチックを含めた高分子材料をマイクロメートルレベルで制御した微粒子に成形するには極めて高い技術が必要である。通常は高分子合成時の重合条件を選択したり、あるいは得られた微粒子を分粒してほぼ一定の粒径をもつ微粒子を調製する。このように粒径分布がそろった、あるいは所望の粒径分布を有する高分子微粒子は複写機トナーのバインダ剤や表面コート剤として極めて有用であり、環境調和型の生分解性プラスチックを安価に微粒子化する技術が高く望まれている。

【0014】上述のように微生物などの生体により合成される高分子材料は生体内に局在、あるいは分散して存在し、その存在様式は用いる生体（動物や植物、あるいは微生物など）や生体環境（温度、圧力、栄養条件など）により制御することができる。例えば、遺伝子組み換えをした微生物では乾燥重量の80%以上のポリエステルを内包することが知られており（現代化学、1998年1月、「微生物がつくり、微生物が分解する環境にやさしいプラスチック」）ほぼ微生物の大きさと等しい高分子微粒子が生体内で合成されている。このような高分子微粒子をそのままの形状で取り出すことができれば、安価かつ効率的に生分解性プラスチック微粒子を調製することができる。

【0015】本発明の目的は、生体内に合成保持された高分子微粒子を、そのままの形状で取得することができ、それを成形工程を経ずにそのまま微粒子状での用途に利用可能とする生体からの高分子微粒子の製造方法を提供することにある。

【0016】

【課題を解決するための手段】本発明は、生体の代謝反応を利用した高分子材料の合成において、生体内に内包されている高分子微粒子をそのままの形状で取り出すことにより、一定の粒径をもつ微粒子や所望の粒径分布をもつ微粒子を調製できるとの本発明者らの新たな知見に基づいてなされたものである。かかる知見に基づく本発明の高分子微粒子の製造方法は、生体を用いた高分子微粒子の製造方法において、高分子微粒子を有する生体を取得する工程と、該生体と、該高分子微粒子以外の生体成分を可溶化する可溶化剤と、を接触させて該高分子微

粒子を含む混合物を得る工程と、該混合物から該高分子微粒子を回収する工程と、回収された高分子微粒子を該高分子微粒子の融点以下の温度で乾燥させて、該高分子微粒子の形状を保ったままの高分子微粒子の乾燥品を得る工程とを有することを特徴とする。

【0017】本発明の製造方法で得られる高分子微粒子の形状や粒径分布等の特性は、生体に特有な場合が多く、生体を選択することで所望とする粒子形及び粒径分布の高分子微粒子を得ることが可能となる。例えば、微生物や細胞を用いる場合、その種類や培養条件あるいは遺伝子操作の有無を選択することにより種々の粒子形や粒径分布をもつ高分子微粒子が得られる。

【0018】

【発明の実施の形態】本発明において高分子微粒子を合成する生体としては、例えば微生物などの原核細胞、あるいは動物や植物などの真核細胞を挙げることができる。微生物の属種は特に制限されるものではなく、サッカロミセス (*Saccharomyces*)、ハンセンラ (*Hansenula*)、カンジダ (*Candida*)、ミクロコッカス (*Micrococcus*)、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*)、ストレプトコッカス (*Streptococcus*)、ロイコノストア (*Leuconostoc*)、ラクトバチルス (*Lactobacillus*)、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*)、アルスロバクター (*Arthrobacter*)、バチルス (*Bacillus*)、クロストリジウム (*Clostridium*)、ノルカルディア (*Norcardia*)、ロドコッカス (*Rhodococcus*)、ロドスピリリウム・ルブルム (*Rhodospirillum rubrum*)、ナイセリア (*Neisseria*)、エシェリシア (*Escherichia*)、エンテロバクター (*Enterobacter*)、セラチア (*Serratia*)、アクロモバクター (*Achromobacter*)、アエロモナス (*Aeromonas*)、アルカリゲネス (*Alcaligenes*)、フラボバクテリウム (*Flavobacterium*)、アセトバクター (*Acetobacter*)、モラクセラ (*Moraxella*)、ニトロソモナス (*Nitrosomonas*)、ニトロバクター (*Nitrobacter*)、チオバチルス (*Thiobacillus*)、グルコノバクター (*Gluconobacter*)、シュードモナス (*Pseudomonas*)、キサントモナス (*Xanthomonas*)、バークホルデルシア (*Burkholderia*)、ビブリオ (*Vibrio*)、コマモナス (*Comamonas*)、プロテウス・ブルガリス (*Proteus vulgaris*)などの細菌、糸状菌、酵母などが挙げられる。また、より高い高分子合成能力をもつ微生物を人為的な変異や遺伝子操作などにより作製し、利用しても構わない。さらに、シネココッカス スピーズ (*Synechococcus* sp.)、アナバエナ・バリアビリス (*Anabaena variabilis*)などの藻類、更には原生動物、赤血球、白血球、腫瘍細胞、培養細胞、動植物細胞などの各種細胞を挙げることができる。例えば、遺伝子組み換え等により生体内で大量に合成された高分子微粒子がほぼその細胞を大きさに匹敵する場合、生物種を選択することにより微粒子の形状を規定することができる。

【0019】また、本発明において生体内で合成される高分子としては、ポリヒドロキシ酪酸、ポリヒドロキシ吉草酸、ポリ乳酸、ポリカプロラクトン、ポリブチレンスクシネート、ポリブチレンアジペート、ポリエチレンスクシネートなどの脂肪族ポリエステル、デンプン、酢酸セルロース、キトサンなどの多糖類、ポリビニルアルコール、ポリグルタミン酸、オリブニルフェノールなどを挙げることができる。

【0020】さらに、生体内で合成される高分子微粒子の形状は上記のような生体の種類のほかに、生体周囲の環境条件によって制御される。例えば、アエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*) という微生物がもつ高分子重合酵素の遺伝子のクローニングを行ない、この遺伝子をアルカリゲネス・ユウトロファス (*Alcaligenes eutrophus*) という重合遺伝子欠損株に導入した微生物では、栄養素である炭素源の種類や濃度により効率的に共重合ポリエステルを合成できることが知られている。また、金属イオンなどのミネラル成分や温度、圧力などの生育条件によって、生体が合成する高分子の組成や形状を変化させることが可能である。このような高分子は、生体のエネルギー源や生体構成材料源として貯蔵されているものであるから、生体が貯蔵を促進するように制御することにより効率的に高分子を得ることができる。

【0021】高分子微粒子として、ポリヒドロキシ酪酸またはポリヒドロキシ吉草酸などのポリヒドロキシアルカノエートを主成分として含むものを生産する場合の微生物としては、例えばバークホルデリア・セバシア (*Burkholderia cepacia*)、ラルストニア・ユウトロファ (*Ralstonia eutropha*)、アルカリゲネス スピーシズ (*Alcaligenes sp.*)、アルカリゲネス・ロータス (*Alcaligenes latus*)、シュウドモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、アエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*)、バチルス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) 及びコマモナス・アシドボランス (*Comamonas acidovorans*) 等を好適なものとして挙げることができる。また、これらの微生物は、単独で、あるいは必要に応じて本発明の効果を損なわない範囲内でその2種以上を組み合わせる用いることができる。

【0022】また、高分子微粒子を生産させるための生体の培養においては、生体を担体に固定して快適な棲息空間を与えることにより、生産される高分子微粒子の組成や形状を制御することもできる。担体としては、これまで医薬品工業や食品工業あるいは排水処理システムなどのバイオリアクタで利用されている多くの担体を用いることができる。例えば、多孔質ガラス、セラミック、金属酸化物、活性炭、カオリナイト、ベントナイト、ゼオライト、シリカゲル、アルミナ、アンスラサイト、などの粒子状担体のほか、でんぷん、寒天、キチン、キトサン、ポリビニルアルコール、アルギン酸、ポ

リアクリルアミド、カラギーナン、アガロース、ゼラチン、などのゲル状担体、セルロース、グルタルアルデヒド、ポリアクリル酸、ウレタンポリマーなどの高分子樹脂やイオン交換樹脂などである。さらに、天然あるいは合成の高分子化合物、例えば綿、麻、パルプ材、あるいは天然物を変性した高分子アセテート、ポリエステル、ポリウレタン、なども利用できる。

【0023】本発明における高分子微粒子の製造方法では、まず高分子微粒子を生産保持した生体を取得する。この生体の取得は、例えば、高分子微粒子を生産し得る微生物や細胞を培養して、培養菌体や細胞マスを取得することで行うことができる。培養は、先に述べたとおり、所望とする高分子微粒子の粒子形や粒径分布が得られるように用いる微生物や細胞の種類に応じて選択する。

【0024】次に、生体内に生産保持された高分子微粒子をそのままの形状で取り出す。高分子微粒子をそのままの形状で生体から取り出すには、高分子微粒子以外の生体成分と高分子微粒子を効果的に分離できる方法が好適に用いられる。具体的には、高分子微粒子は可溶化せずに、高分子微粒子以外の生体成分を可溶化する可溶化剤で生体を処理した後に、高分子微粒子を洗浄して可溶化成分を除去し、これを乾燥することによって生体からの高分子微粒子のその形状を保った状態での取得が可能となる。

【0025】可溶化剤には高分子微粒子が膨潤・溶解しない有機溶媒を用いることもできるが、高分子微粒子の形状や性状を変化させないためにはより温和な可溶化剤、例えば次亜塩素酸などが望ましい。次亜塩素酸ナトリウムを用いる場合は、次亜塩素酸ナトリウムを水溶液とし、その有効塩素濃度が0.05~5重量%であるものが好ましい。

【0026】また、可溶化反応を促進する目的で可溶化処理の前に高分子微粒子以外の生体成分を物理的にあるいは化学的に破壊してもよい。例えば、タンパク質を変性させる、例えばpH9以上のアルカリで処理する、生体成分を分解するリゾチームなどの酵素で処理する、あるいは加圧破碎や超音波破碎など物理的な処理を行なってもよい。

【0027】可溶化剤と生体とを接触させて、高分子微粒子以外の生体成分を可溶化して得られた混合物（高分子微粒子分散液）からの高分子微粒子の回収は、遠心分離による濃縮と水による洗浄により、すなわち最初の遠心分離で得られる沈降物を含むスラリー部分を回収し、水と混合して再度遠心分離にかけて沈降物を含むスラリー部分を回収し、この操作を必要に応じて繰り返すことで行うことができる。遠心分離における遠心条件は、製造される高分子微粒子の種類や粒径分布などによって選択することができる。

【0028】例えば、0.5 μm のPHB微粒子を回収する場合、8000gで10分間遠心して高分子微粒子

を沈降させる。この上澄みを捨てて、ほぼ同量の水を加え、その後沈降した微粒子を攪拌する。この操作を3回繰り返すことで高分子微粒子の洗浄、回収を行うことができる。

【0029】こうして得られたスラリーを乾燥させることで、粒子形を保った状態の高分子微粒子を得ることができる。この乾燥処理は、風乾処理や凍結乾燥処理が利用できる。風乾処理は必要に応じて温風や熱風を用いることができ、高分子微粒子の凝集を避けるという観点からは高分子微粒子がその融点に達しない温度が好ましくは、更に好ましくはそれがガラス転移温度に達しないようにして行なうのがよい。

【0030】本発明においては、例えば粒径が0.1 μm ～5 μm の範囲内にある高分子微粒子を得ることができ、その粒径分布に応じてバインダやコート剤、あるいはマイクロ構造物として利用することができる。

【0031】

【実施例】以下、実施例などにより本発明を詳述するが、これらは本発明をなんら限定するものではない。実施例1 (Burkholderia cepacia KK01株による高分子微粒子の合成)

はじめに、1.0重量%のピルビン酸ナトリウムを含む200 mlのM9培地 (Na_2HPO_4 : 6.2 g/l、 KH_2PO_4 : 3.0 g/l、 NaCl : 0.5 g/l、 NH_4Cl : 1.0 g/l、pH7.0、以下同様) を調製した。次に、KK01株 (FERM BP-4235) をこの培地に植菌し、120 rpmで振盪しながら30℃で3日間培養を行った。

【0032】なお、バークホルデリア・セバシア (Burkholderia cepacia) KK01株は、通産省、工業技術院、生命工学工業技術研究所にブダペスト条約下の国際寄託として寄託されている (寄託日: 平成4年3月11日、受託番号は上記のとおり)。寄託当初はシュードモナス (Pseudomonas) 属に属するものとされたが、その後尚、シュードモナス・セバシアの分類学上の位置のバークホルデリア・セバシアへの変更にもなっており、ここではKK01株をバークホルデリア属に属するものとして記載するが、寄託されている株自体に変更はない。また、特開平6-296711号公報において、このKK01株がフェノール等の芳香族化合物を誘導物質としてTCE等の有機塩素化合物を分解することが開示されているものである。

【0033】微生物濃度がおよそ 5×10^8 cell/mlとなったところで遠心分離により微生物を濃縮した。次に、濃縮した微生物を1.0重量%のピルビン酸ナトリウムを含む培地 (Na_2HPO_4 : 6.2 g/l、 KH_2PO_4 : 3.0 g/l、 NaCl : 0.5 g/l、pH7.0) に再度懸濁し、30℃で3.5日間さらに培養を続け、微生物内にPHB (ポリ- β -ヒドロキシブチレート) 高分子を蓄積させた。

【0034】得られた培養液を遠心分離して微生物を濃縮し、これを次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (有効塩素濃度5%) 5 mlに再度懸濁した。これを45℃で1時間放置することにより高分子微粒子以外の生体成分を可溶化し

た。遠心分離による濃縮と純水による洗浄をさらに3回繰り返して可溶性成分を除去し、これを15℃で風乾させて高分子微粒子の粉体を得た。得られた粉体の重量は約40 mgであった。

【0035】次に、この高分子微粒子を導電性テープによりアルミ製の試料台に固定し、イオンコーターにより金を薄く蒸着した。走査型電子顕微鏡により高分子微粒子の形状を観察したところ、微粒子間の融着もほとんどない真球状の微粒子が見られ、その粒径も揃っており、その平均粒径は $0.6 \pm 0.2 \mu\text{m}$ であった。また、高分子微粒子以外の生体成分は完全に除去されていたことが確認された。

【0036】また、得られた高分子微粒子をテトラヒドロフランに溶解し、その分子量をゲルクロマトグラフィーにより測定したところ、平均分子量500,000の値が得られた。さらに、得られた高分子微粒子をスクリュウキャップ付き10ml試験管に入れ、クロロホルム2mlと3重量%硫酸-メタノール溶液2 mlを添加して密栓後100℃で3.5時間反応させ、メタノリシスによりモノマー化した。これに水1mlを加え、10分間激しく振盪して、下層のクロロホルム層を取り出し、このクロロホルム層をガスクロマトグラフィーにより分析した。得られたクロマトグラムの中で主成分であるピークが標品であるヒドロキシ酪酸のメチル化合物との保持時間が同一であることから、得られた高分子微粒子の主成分はポリヒドロキシ酪酸であることを確認した。

【0037】また、上記の可溶化処理において、次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (有効塩素濃度0.05%) を用いて45℃で10時間放置、あるいは次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (有効塩素濃度0.5%) を用いて45℃で5時間放置しても同様な高分子微粒子が得られることを確認した。

【0038】比較例1 (Burkholderia cepacia KK01株による高分子微粒子の合成)

実施例1と同様にして、微生物内にPHB高分子を蓄積させた。得られた培養液を遠心分離して微生物を濃縮し、以下の4つの方法により高分子微粒子以外の生体成分を除去した。

(1) 10重量%のドデシル硫酸ナトリウム水溶液を添加した後、これを-80℃で凍結する。これを超音波処理をしながら融解し、遠心分離後に純水で洗浄した15℃で風乾する。

(2) アセトンで洗浄して遠心分離した後、エタノールで洗浄する。再度遠心分離し、最後に純水で洗浄して15℃で風乾する。

(3) 1Nの NH_4OH に懸濁して45℃で1時間処理する。遠心分離後に純水で洗浄して15℃で風乾する。

(4) 1 mMのEDTAと重量0.1%のリゾチームを含む水溶液5 mlに懸濁し、20℃で1時間処理する。遠心分離後に純水で洗浄して15℃で風乾する。

【0039】以上のような処理により得られた高分子を

導電性テープによりアルミ製の試料台に固定し、イオンコーターにより金を薄く蒸着した。走査型電子顕微鏡により高分子の形状を観測したところ、(1)及び(2)の方法では高分子以外の生体成分はほとんど完全に除去できていたが、微粒子の変形および微粒子同士の融着が見られ、均一形状の分散した微粒子は得られなかった。また、(3)及び(4)の方法では細胞膜がかなり残存しているため不純物は多く、形態も不均一で工業材料としては不適であった。

【0040】実施例2 (Ralstonia eutropha TB64株による高分子微粒子の合成)
茨城県で採取し、単離された土壌微生物Ralstonia eutropha TB64株 (通産省、工業技術院、生命工学工業技術研究所、寄託番号: FERM P-16980、寄託日: 平成10年9月30日) は、以下の菌学的性質を示す微生物である。

(1) 形態観察

細胞の形: 桿菌 (0.3~0.5×1.0~2.0 mm)

孢子: 無

鞭毛: 有 (周鞭毛)

グラム染色性

・18時間: 陰性

・24時間: 陰性

・36時間: 陰性

(2) 生理・生化学試験

嫌気下での生育: 陰性

カタラーゼ: 陽性

オキシダーゼ: 陽性

リトマスミルク: アルカリ

硝酸塩の還元: 陰性

V-P反応: 陰性

V-P培地のpH: 7.76

カゼインの分解: 陰性

ゼラチンの分解: 陰性

澱粉の分解: 陰性

DNAの分解: 陰性

尿素の分解: 陰性

Tween20の分解: 陰性

Tween40の分解: 陰性

Tween60の分解: 陰性

Tween80の分解: 陰性

チロシンの分解: 陽性

有機酸の利用

・クエン酸: 陽性

・プロピオン酸: 陽性

・酢酸: 陽性

・フマル酸: 陽性

・レリング酸: 陽性

・コハク酸: 陽性

無機窒素源の利用

・アンモニウム塩: 陽性

・硝酸塩: 陽性

インドールの生成: 陰性

硫化水素の生成: 陰性

色素の生成

・P agar: 陰性

・F agar: 陰性

・King A agar: 陰性

・King B agar: 陰性

NaCl存在下での生育

・2%: 陽性

・5%: 陰性

・7%: 陰性

生育pH: 5.0~9.0

生育温度: 10℃~40℃

0.02%アジ化ナトリウム存在下での生育: 陰性

0.001%リゾチウム存在下での生育: 陽性

OFテスト: 陰性

糖からの酸の生成

・グルコース: 陰性

・アラビノース: 陰性

・フラクトース: 陰性

・ガラクトース: 陰性

・マルトース: 陰性

・ラクトース: 陰性

・シュクロース: 陰性

・キシロース: 陰性

・トレハロース: 陰性

・グリセロール: 陰性

・マンニトール: 陰性

・ソルビトール: 陰性

・ソルボース: 陰性

・マンノース: 陰性

・ラムノース: 陰性

・アドニトール: 陰性

ガスの生成

・グルコース: 陰性

・アラビノース: 陰性

・キシロース: 陰性

・マンニトール: 陰性

(3) キノン組成分析

【0041】

【表1】

キノン分子種	組成比 (%)
ユビキノン-8	95.4

はじめに、1.0重量%のビルビン酸ナトリウムを含む200 mlのM9培地を調製した。次に、TB64株をこの培地に植菌

し、120rpmで振盪しながら30℃で2日間培養を行った。微生物濃度がおよそ 3×10^8 cell/mlとなったところで遠心分離により微生物を濃縮した。次に、濃縮した微生物を1.0重量%のピルビン酸ナトリウムを含む培地 (Na_2HPO_4 : 6.2 g/l, KH_2PO_4 : 3.0 g/l, NaCl : 0.5 g/l, pH7.0) に再度懸濁し、30℃で3日間さらに培養を続け、微生物内にPHB高分子を蓄積させた。

【0042】得られた培養液から実施例1と同様にして高分子微粒子を得た。得られた粉体の重量は約27 mgであった。また、実施例1と同様にして高分子微粒子の形状を観察したところ、真球状の微粒子が見られ、その平均粒径は $0.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$ であった。さらに、高分子微粒子以外の生体成分は完全に除去されていた。

【0043】高分子微粒子の成分を実施例1と同様にして同定したところ、主成分としてポリヒドロキシ酪酸、副成分としてポリヒドロキシ吉草酸が含まれていることを確認した。さらに、乾燥工程において-10℃で凍結乾燥を行なっても同様な高分子微粒子が得られることを確認した。

【0044】実施例3 (*Alcaligenes* sp. TL2株による高分子微粒子の合成)

はじめに、1.0重量%のピルビン酸ナトリウムを含む200 mlのM9培地を調製した。次に、TL2株 (FERM P-14642) をこの培地に植菌し、120rpmで振盪しながら30℃で3日間培養を行った。微生物濃度がおよそ 2×10^8 cell/mlとなったところで遠心分離により微生物を濃縮した。次に、濃縮した微生物を1.0重量%のピルビン酸ナトリウムを含む培地 (Na_2HPO_4 : 6.2 g/l, KH_2PO_4 : 3.0 g/l, NaCl : 0.5 g/l, pH7.0) に再度懸濁し、30℃で2日間さらに培養を続け、微生物内にPHB高分子を蓄積させた。

【0045】なお、アルカリゲネス スピーズTL2株 (通産省、工業技術院、生命工学工業技術研究所、寄託番号: FERM P-14642、寄託日: 平成6年11月15日) は、特開平8-154669号公報において、フェノール等の芳香族化合物を資化し、かつこれらの化合物を誘導物質としてTCE等の有機塩素化合物を分解することが開示されたものである。

【0046】得られた培養液から微生物を遠心分離して濃縮し、これをpH10の水酸化ナトリウム水溶液5mlに懸濁して20℃で3時間放置して細胞膜を変性させた。この後、実施例1と同様にして高分子微粒子を得た。得られた粉体の重量は約22mgであった。また、実施例1と同様にして高分子微粒子の形状を観察したところ、真球状の微粒子が見られ、その平均粒径は $0.4 \pm 0.1 \mu\text{m}$ であった。さらに、高分子微粒子以外の生体成分は完全に除去されていた。高分子微粒子の成分を実施例1と同様にして同定したところ、主成分はポリヒドロキシ酪酸であることを確認した。

【0047】実施例4 (*Pseudomonas putida* (ATCC23289)による高分子微粒子の合成)

ATCCのマニュアルに従い、栄養培地 (Difco0003) に菌株を植菌し、120 rpmで振盪しながら30℃で2日間培養を行った。遠心分離により微生物を濃縮し、これを1.0重量%のピルビン酸ナトリウムを含む培地 (Na_2HPO_4 : 6.2 g/l, KH_2PO_4 : 3.0 g/l, NaCl : 0.5 g/l, pH7.0) に再度懸濁して、30℃で2日間さらに培養を続け、微生物内にPHB高分子を蓄積させた。

【0048】得られた培養液から微生物を遠心分離して濃縮し、これを0.1重量%のリゾチームを含む水溶液に懸濁して20℃で5時間放置して細胞膜を化学的に破碎した。この後、実施例1と同様にして高分子微粒子を得た。得られた粉体の重量は約15mgであった。また、実施例1と同様にして高分子微粒子の形状を観察したところ、真球状の微粒子が見られ、その平均粒径は $0.3 \pm 0.1 \mu\text{m}$ であった。さらに、高分子微粒子以外の生体成分は完全に除去されていた。

【0049】高分子微粒子の成分を実施例1と同様にして同定したところ、主成分はポリヒドロキシ酪酸であることを確認した。

【0050】実施例5 (*Alcaligenes latus* (ATCC29712)による高分子微粒子の合成)

ATCCのマニュアルに従い、グルコースを含むミネラル培地 (培養培地1018) に菌株を植菌し、120 rpmで振盪しながら30℃で3日間培養を行った。遠心分離により微生物を濃縮し、これを窒素源を除いた上記培地に再度懸濁して、30℃で3日間さらに培養を続け、微生物内にPHB高分子を蓄積させた。

【0051】得られた培養液から微生物を遠心分離して濃縮し、これに10℃に保ちながら超音波 (20 kHz、平均出力60W) を20分間照射して物理的に細胞膜を化学的に破碎した。この後、実施例1と同様にして高分子微粒子を得た。得られた粉体の重量は約17 mgであった。また、実施例1と同様にして高分子微粒子の形状を観察したところ、真球状の微粒子が見られ、その平均粒径は $0.4 \pm 0.1 \mu\text{m}$ であった。さらに、高分子微粒子以外の生体成分は完全に除去されていた。

【0052】高分子微粒子の成分を実施例1と同様にして同定したところ、主成分はポリヒドロキシ酪酸であることを確認した。

【0053】実施例6 (*Aeromonas caviae* (ATCC13137)による高分子微粒子の合成)

ATCCのマニュアルに従い、栄養培地 (Difco0003) に菌株を植菌し、120 rpmで振盪しながら30℃で3日間培養を行った。遠心分離により微生物を濃縮し、これを1.0重量%のピルビン酸ナトリウムを含む培地 (Na_2HPO_4 : 6.2 g/l, KH_2PO_4 : 3.0 g/l, NaCl : 0.5 g/l, pH7.0) に再度懸濁して、30℃で4日間さらに培養を続け、微生物内にPHB高分子を蓄積させた。得られた培養液から実施例1と同様にして高分子微粒子を得た。得られた粉体の重量は約32 mgであった。また、実施例1と同様にして高分子微

粒子の形状を観察したところ、真球状の微粒子が見られ、その平均粒径は $0.6 \pm 0.2 \mu\text{m}$ であった。さらに、高分子微粒子以外の生体成分は完全に除去されていた。更に、高分子微粒子の成分を実施例1と同様にして同定したところ、主成分はポリヒドロキシ酪酸であることを確認した。

【0054】実施例7 (Bacillus megaterium (ATCC11561)による高分子微粒子の合成)

ATCCのマニュアルに従い、栄養培地(22 Bacillus medium(1/4 strength))に菌株を植菌し、120 rpmで振盪しながら 26°C で2日間培養を行った。遠心分離により微生物を濃縮し、これを1.0重量%のビルビン酸ナトリウムを含む培地(Na_2HPO_4 : 6.2g/l、 KH_2PO_4 : 3.0g/l、 NaCl : 0.5 g/l、pH7.0)に再度懸濁して、 26°C で3日間さらに培養を続け、微生物内にPHB高分子を蓄積させた。得られた培養液から実施例1と同様にして高分子微粒子を得た。得られた粉体の重量は約11 mgであった。また、実施例1と同様にして高分子微粒子の形状を観察したところ、真球状の微粒子が見られ、その平均粒径は $0.3 \pm 0.1 \mu\text{m}$ であった。さらに、高分子微粒子以外の生体成分は完全に除去されていた。また、高分子微粒子の成分を実施例1と同様にして同定したところ、主成分はポリヒドロキ

シ酪酸であることを確認した。

【0055】実施例8 (Comamonas acidovorans (ATCC9355)による高分子微粒子の合成)

ATCCのマニュアルに従い、栄養培地(Difco0003)に菌株を植菌し、120 rpmで振盪しながら 26°C で3日間培養を行った。遠心分離により微生物を濃縮し、これを1.0重量%のビルビン酸ナトリウムを含む培地(Na_2HPO_4 : 6.2g/l、 KH_2PO_4 : 3.0g/l、 NaCl : 0.5 g/l、pH7.0)に再度懸濁して、 26°C で3日間さらに培養を続け、微生物内にPHB高分子を蓄積させた。得られた培養液から実施例1と同様にして高分子微粒子を得た。得られた粉体の重量は約14 mgであった。また、実施例1と同様にして高分子微粒子の形状を観察したところ、真球状の微粒子が見られ、その平均粒径は $0.4 \pm 0.1 \mu\text{m}$ であった。さらに、高分子微粒子以外の生体成分は完全に除去されていた。また、高分子微粒子の成分を実施例1と同様にして同定したところ、主成分はポリヒドロキシ酪酸であることを確認した。

【0056】

【発明の効果】本発明により、高分子以外の生体成分を含まない高純度で、かつ真球状の形状が均一な高分子微粒子を合成および取得することができた。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	(参考)
(C 1 2 P 7/62			
C 1 2 R 1:40)			
(C 1 2 P 7/62			
C 1 2 R 1:11)			
(72)発明者 須川 悦子		F ターム(参考) 4B064 AD83 CA02 CE02 CE16 DA16	
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内			